

(57) 要約

配列表1及び2で示されるDNAおよび該DNAを発現ベクターに挿入し、遺伝子工学的手法によって分子量約60kD（還元条件下）の約60kD及び約120kD（非還元条件下）の破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質を製造する方法。

この蛋白質は、破骨細胞形成抑制作用を有し、骨粗鬆症、リウマチ症の治療に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード（参考情報）

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-------------|----|-------------------|----|------------|
| AL | アルバニア | ES | スペイン | LK | スリランカ | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FR | フランス | LS | レソト | SI | スロヴェニア共和国 |
| AU | オーストラリア | GA | ガボン | LT | リトアニア | SK | スロヴァキア共和国 |
| AZ | アゼルバイジャン | GB | 英国 | LU | ルクセンブルグ | SL | シエラレオネ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ共和国 | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GW | ギニアビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | ID | インドネシア | MR | モリタニア | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UA | ウクライナ |
| CC | 中央アフリカ共和国 | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UG | ウガンダ |
| CG | コンゴ | IS | アイスランド | NE | ニジェール | US | 米国 |
| CH | スイス | IT | イタリア | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン |
| CI | コート・ジボアール | JP | 日本 | NO | ノルウェー | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェコ共和国 | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | KR | 大韓民国 | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | RU | ロシア連邦 | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン | | |
| | | LI | リヒテンシュタイン | | | | |

明 細 書

新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

技術分野

本発明は、新規なDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性（以下、破骨細胞形成抑制活性という）を有する蛋白質を製造する方法に関する。詳しくは、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びこのゲノムDNAを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

発明の背景

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を

促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー(fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987)、インシュリン様増殖因子-I(insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA(Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン(Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー(bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutson R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993)等のサイトカインが報告されている。

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988)やインターロイキン-4(interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993)等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992)、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J. Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- γ (interferon- γ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986)等が報告されている。

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニン₁は、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。又、現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索の結果、既にヒト胎児肺線維芽細胞 I MR-90 (ATCC寄託-受託番号 CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFを見出している (PCT/JP96/00374号)。この破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFの由来について、さらに鋭意探索したところ、ヒト由来OCIFのゲノムDNAの塩基配列を決定するに至った。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明は、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。本発明のDNAは、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含む。

また、本発明は、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び/又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝

子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

(a) 分子量(SDS-PAGE による) ;

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性 ;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性 ;

(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例4(iii)における、本発明ゲノムDNAを発現して得られた蛋白質の、ウェスタンブロッティングの結果を示す。ここで 1はマーカー、2はベクターpWESR α OCIFをトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(実施例4(iii))、3はベクターpWESR α をトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(対照)である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNAは、ヒト胎盤ゲノムDNAとコスミドベクターを用いてコスミドライブラリーを作製し、このライブラリーをOCIF cDNAをもとに作製したDNA断片をプローブとしてスクリーニングすることにより得られる。このようにして得られたゲノムDNAを適当な発現ベクターに挿入してOCIF発現コスミドを作製し、常法により各種の細胞及び菌株などの宿主にトランスフェクトして発現させることにより、組み換え型OCIFを製造することができる。得られた破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質（破骨細胞形成抑制因子）は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例 1

コスミドライブラリーの作製

ヒト胎盤ゲノムDNA(クローンテック社; Cat.No. 6550-2)とpWE15 コスミドベクター(ストラタジーン社)を用いてコスミドライブラリーを作製した。基本的には、ストラタジーン社のpWE15 コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って実施したが、DNA、大腸菌、ファージを扱う一般的方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory(1989))を参考に従った。

(i) ヒト・ゲノムDNA 制限酵素分解物の調製

1.5ml のエッペンドルフチューブ4本(チューブA、B、C、D)に10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100mM NaClを含む溶液 750 μ l に溶かしたヒト胎盤ゲノムDNAをそれぞれ 100 μ g入れ、チューブA には 0.2ユニット、チューブB には0.4 ユニット、チューブC には 0.6ユニット、チューブD には 0.8ユニットの制限酵素MboIを添加して1時間消化した。その後、それぞれのチューブに20mMになるようにEDTAを添加して反応を止め、フェノール/クロロホルム(1:1)で抽出し、水相に2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。遠心分離でDNAを回収したあと、70%エタノールで洗い、それぞれのチューブの中のDNAを100 μ lのTEに溶解した。4本のチューブのDNAを1本にまとめ、68 $^{\circ}$ Cにて10分保温したのち室温に戻し、これを遠心管(38 ml)の中で作製した10%-40%直線状ショ糖密度勾配に重層した。ショ糖密度勾配は20mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA、1M NaClを含む緩衝液のなかで作製した。この遠心管を日立製作所SRP28SAローターを用いて20 $^{\circ}$ Cで26,000rpmにて24時間遠心したのち、フラクションコレクターを用いてショ糖密度勾配を0.4ml ずつのフラクションに分画した。各フラクションの一部を0.4%アガロース電気泳動にかけてDNAのサイズを確認したのち、およそ30kb(キロベースペア)から40kbの長さのDNAを含むフラクションを集め、糖濃度を10%以下になるようTEで希釈したのちエタノールを2.5倍量加えてDNAを沈殿させた。DNAはTE(10mM HCl(pH8.0)+1mM EDTA緩衝液(以下TEという))に溶解したのち4 $^{\circ}$ Cで保存した。

(ii) コスミド・ベクターの準備

ストラタジーン社の pWE15 コスミドベクターをコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って制限酵素 BamHI によって完全消化したのち、エタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。この DNA の 5' 末端のリン酸を子牛小腸アルカリ性フォスファターゼを用いて除いた後、フェノール抽出とエタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。

(iii) ゲノム DNA のベクターへのライゲーション及び in vitro パッケージング

1.5 μ g のサイズ分画したゲノム DNA と 3 μ g の制限酵素 BamHI で消化した pWE15 コスミドベクターをファルマシア社の Ready-To-Go T4DNA ライゲースを用いて 20 μ l の反応溶液中でライゲーションした。ライゲーションした DNA を、ギガパック II パッケージングエクストラクト（ストラタジーン社）を用い、プロトコールに従って in vitro パッケージングした。パッケージング反応後、反応液の一部を SM 緩衝液で段階的に希釈し、10mM MgCl₂ に懸濁した大腸菌 XL1-Blue MR（ストラタジーン社）と混合してファージを感染させたのち、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB アガープレートに蒔き、生ずるコロニーの数を計数した。この結果を基にパッケージング反応液 1 μ l 当たりのコロニー数を算出した。

(iv) コスミドライブラリーの作製

上記の方法で作製したパッケージング反応液と大腸菌 XL1-Blue MR を混合し、直径 15cm のアガロースプレート当たり 50,000 個のコロニーが生ずるようにアンピシリンを含むアガロースプレートに蒔いた。一夜 37°C でプレートを保温したのち、プレート一枚当たり 3ml の LB 培地を加えて大腸菌のコロニーを懸濁し、回収した。アガロースプレートをさらに 3ml の LB 培地で 1 回洗い、これを基の大腸菌懸濁液と合わせた。すべてのアガロースプレートから回収した大腸菌を一本の遠心管にまとめ、グリセロールを 20% となるように添加し、さらにアンピシリンを 50 μ g/ml となるように加えた。十分混合したのち一部を分取し、残りを -80°C に保

存した。分取した大腸菌を段階希釈してアガープレートに蒔き、1ml 当たりのコロニー数を算出した。

実施例 2

コスミドライブラリーのスクリーニングとコロニーの純化

50 μ g/ml のアンピシリンを含む直径15cmのLBアガロースプレートに直径14.2cm のニトロセルロースフィルター（ミリポア社）を乗せ、その上にプレート一枚当たり50,000個の大腸菌コロニーが生ずるようにコスミドライブラリーを蒔き、37℃にて一夜保温した。常法に従ってニトロセルロースフィルター上の大腸菌を別のニトロセルロースフィルターに転写してレプリカフィルターを2枚作製した。コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従い、レプリカフィルター上の大腸菌をアルカリ変成、中和し、ストラタリンカー（ストラタジーン社）を用いてDNA をニトロセルロースフィルター上に固定した。さらにこのフィルターを減圧オープン中で80℃で2 時間加熱した。このように処理したニトロセルロースフィルターを、ヒトOCIFcDNAの5' 末端と3' 末端から作製した2 種のDNA をプローブとしてハイブリダイズした。即ち、OCIFcDNAを含む大腸菌 pBK/OIF10（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所寄託、受託番号FERM BP-5267）よりプラスミドを精製し、OCIFcDNAを含むプラスミドを制限酵素KpnIとEcoRI で消化し、生ずるフラグメントをアガロースゲルを用いて分離したのち、0.2kb のKpnI/EcoRIフラグメントをQIAEX IIゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このDNA をメガプライムDNA ラベリングシステム（アマシャム社製）を用いて³²P で標識した（5'-DNAプローブ）。また別に、得られたプラスミドを制限酵素 BamHIと制限酵素 EcoRVで消化して生ずる0.2kb のBamHI/EcoRV フラグメントを同様に精製し、上記の方法で³²P 標識した（3'-DNAプローブ）。上記レプリカフィルターのうち一枚を5'-DNAプローブと、別の一枚を3'-DNAプローブとハイブリダイズした。コロニーハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄はコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに述べられた方法に従っ

て行った。オートラジオグラフィーの結果それぞれのプローブで複数個の陽性シグナルが検出されたが、両方のプローブにハイブリダイズする陽性シグナルが一個検出された。このシグナルに相当するアガロースプレート上のコロニーを精製することにより純化したコロニーを単離した。純化されたコロニーから常法に従ってコスミドを精製しpWEOCIF と命名した。このコスミドに含まれるヒトゲノムDNA のサイズはおよそ38kbであった。

実施例 3

ヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定

(i) OCIF ゲノムDNA のサブクローニング

コスミドpWEOCIFを制限酵素EcoRIを用いて消化し、生じたフラグメントを0.7%アガロースゲルに供与して分離したのち、サザンブロット法によってDNA をナイロン膜 (Hybond-N、アマシャム社) に移し、ストラタリンカー (ストラタジーン社) を用いてDNA をナイロン膜に固定した。一方、プラスミドpBKOCIF を制限酵素EcoRI によって消化し、ヒトOCIFcDNAを含む1.6kb のフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム社) を用いて³²P 標識した。常法に従って上記ナイロン膜と³²P 標識した1.6kb のOCIFcDNAをハイブリダイズさせた結果、6kb、4kb、3.6kb、2.6kbのDNAフラグメントがハイブリダイズすることがわかった。ヒトOCIFcDNAとハイブリダイズするこれらのフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、それぞれpBluescript II SK+ベクター (ストラタジーン社) のEcoRI サイトに常法に従ってサブクローニングし、得られたプラスミドをそれぞれpBSE6、pBSE4、pBSE3.6、pBSE2.6 と命名した。

(ii) 塩基配列の決定

上記プラスミドにサブクローニングされたヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定にはABI ダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングレディーリアクションキット (パーキンエルマー社) と373 シーケンシングシステム (アプ

ライドバイオシステムズ社)を使用した。塩基配列決定用プライマーはヒトOCIF cDNAの塩基配列(配列表配列番号4)をもとに合成した。また、塩基配列が決定された部分をもとにしてさらにプライマーを合成した。決定された塩基配列を配列表配列番号1及び2に示す。配列番号1にはOCIF遺伝子の第1エクソンが含まれ、配列番号2には第2、第3、第4、第5エクソンが含まれる。第1エクソンと第2エクソンの間にはおよそ17kbのヌクレオチドが介在する。

実施例4

COS-7細胞による組み換え型OCIFの生産

(i) OCIFゲノムDNA発現コスミドの作製

OCIFゲノムDNAを動物細胞で発現させるために、コスミドベクターpWE15(ストラタジーン社)に発現プラスミドpcDL-SR α 296(Molecular and Cellular Biology, vol.8, p466-472, 1988)の発現ユニットを挿入した。まず、発現プラスミドpcDL-SR α 296を制限酵素SalIで消化してSR α プロモーター、SV40後期スプライス信号、ポリ(A)付加信号などを含む約1.7kbの発現ユニットを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、コスミドベクターpWE15を制限酵素EcoRIで消化し、アガロース電気泳動によって分離後、8.2kbのpWE15 DNAをQIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。これら二つのDNA断片末端をDNAブランディングキット(宝酒造社)を用いて平滑化し、DNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いて結合させ、大腸菌DH5 α (ギブコBRL社)に導入した。得られた形質転換株を増殖させ、発現ユニットを含む発現コスミドpWESR α をキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。

前記(i)で得られた約38kbのOCIFゲノムDNAが挿入されたコスミドpWEOCIFを制限酵素NotIで消化して約38kbのOCIFゲノムDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、発現コスミドpWESR α を制限酵素EcoRIで消化し、フ

エノール、クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿し、TEに溶解した。この制限酵素EcoRI で消化されたpWESR α とEcoRI-XmnI-NotI アダプター(#1105、#1156 ; ニューイングランドバイオラボ社)をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、アガロース電気泳動によってフリーのアダプターと分離後、QIAEX II ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。制限酵素NotI で消化された約37kbのOCIFゲノムDNAとアダプターを付加したpWESR α をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、ギガパックIIパッケージングエクストラクト(ストラタジーン社)を用いてインヴィトロパッケージングを行い、大腸菌XL1-Blue MR (ストラタジーン社)に感染させた。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFゲノムDNAが挿入された発現コスミドpWESR α OCIFをキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。OCIF発現コスミドpWESR α OCIFをエタノールによって沈殿させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

(ii)OCIFゲノムDNAのトランジェントな発現及びOCIF活性の測定

前記(i) で得られたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換え型OCIFを発現させ、その活性を測定した。 8×10^5 個のCOS-7 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、RCB0539)を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清(ギブコBRL社)を含むDMEM培地(ギブコBRL社)を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン(ギブコBRL社)添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地(ギブコBRL社)を用いて希釈しておいたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。対照として発現コスミドpWESR α を用い、細胞に同様に加えた。用いたコスミドDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3 μ g 及び12 μ l であった。24時間後、培地を除き1.5ml の新しいEX-CELL301培地(JRH バイオサイエンス社)を加え、さらに48時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・

酵素 Vol. 34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol. 122, p1373 (1988)) に従い測定した。生後約17日のマウス骨髓細胞からの活性型ビタミンD₃存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質(OCIF)の活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、 2×10^{-8} Mの活性型ビタミンD₃と10%牛胎児血清を含む α -MEM培地(ギブコBRL社)で希釈したサンプル 100 μ l を入れ、生後約17日のマウス骨髓細胞 3×10^5 個を 100 μ l の10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO₂、37°C、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液のうち 160 μ l を廃棄し、 1×10^{-8} M活性型ビタミンD₃及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地で希釈したサンプル 160 μ l を添加した。培養7日後に細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte, Cat.No. 387-A; シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。結果を表1に示す。この結果より、IMR-90の培養液から得られた天然型OCIF及びCHO細胞で生産した組み換え型OCIFと同様の活性を、この培養液が有することが確認された。

表 1

COS-7細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

| 希釈率 | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 |
|--------------------|------|------|------|------|-------|-------|
| OCIF genomic DNA導入 | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - |
| ベクター導入 | - | - | - | - | - | - |
| 未処理 | - | - | - | - | - | - |

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

(iii)ウエスタンブロッティングによる生産物の確認

上記(ii)で得られたOCIF活性測定用サンプルを10 μ l 取り、10 μ l のSDS-PAGE用サンプルバッファー(0.5M Tris-HCl、20% グリセロール、4% SDS、20 μ g/mlブロムフェノールブルー、pH 6.8)を加えて100℃で3分間煮沸したのち、非還元状態で10% SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、セミドライブロッティング装置(バイオラッド社)を用いて蛋白質をゲルからPVDFメンブレン(ProBlott、パーキンエルマー社)にブロッティングした。そのメンブレンをブロッキング後、先に得られたOCIF蛋白質を西洋ワサビパーオキシダーゼで常法により標識した西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに37℃で2時間保温した。洗浄後、ECL システム(アマシャム社)を用いて抗OCIF抗体が結合している蛋白質を検出した。第1図に示すようにpWESR α OCIFをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清からは、分子量約120キロダルトンと60キロダルトンの2本のバンドが検出された。一方、pWESR α ベクターのみをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清を同様の方法で解析した結果、120キロダルトンと60キロダルトンのバンドは検出されなかった。この結果より、得られた蛋白質はOCIFであることが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によると破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法が提供される。本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び

改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

微生物への言及

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託日：平成7年6月21日

(平成7年6月21日に原寄託され、平成7年10月25日にブダ
ペスト条約に基づく国際寄託へ移管)

受託番号：FERM BP-5267

1 5

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 3 1 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-1)

配列 :

| | |
|--|------|
| CTGGAGACAT ATAAC TTGAA CACTTGGCCC TGATGGGGAA GCAGCTCTGC AGGGACTTTT | 60 |
| TCAGCCATCT GTAAACAATT TCAGTGGCAA CCCGCGAACT GTAATCCATG AATGGGACCA | 120 |
| CACTTTACAA GTCATCAAGT CTAAC TTCTA GACCAGGGAA TTAATGGGGG AGACAGCGAA | 180 |
| CCCTAGAGCA AAGTGCCAAA CTTCTGTCTA TAGCTTGAGG CTAGTGGAAG GACCTCGAGG | 240 |
| AGGCTACTCC AGAAGTTCAG CGCGTAGGAA GCTCCGATAC CAATAGCCCT TTGATGATGG | 300 |
| TGGGGTTGGT GAAGGGAACA GTGCTCCGCA AGGTTATCCC TGCCCCAGGC AGTCCAATTT | 360 |
| TCACTCTGCA GATTCTCTCT GGCTCTAACT ACCCCAGATA ACAAGGAGTG AATGCAGAAT | 420 |
| AGCACGGGCT TTAGGGCCAA TCAGACATTA GTTAGAAAAA TTCCTACTAC ATGGTTTATG | 480 |
| TAAAC TTGAA GATGAATGAT TGCGAACTCC CCGAAAAGGG CTCAGACAAT GCCATGCATA | 540 |
| AAGAGGGGCC CTGTAATTTG AGGTTTCAGA ACCCGAAGTG AAGGGGTCAG GCAGCCGGGT | 600 |
| ACGGCGGAAA CTCACAGCTT TCGCCCAGCG AGAGGACAAA GGTCTGGGAC AACTCCAAC | 660 |
| TGCGTCCGGA TCTTGGCTGG ATCGGACTCT CAGGGTGGAG GAGACACAAG CACAGCAGCT | 720 |
| CCCCAGCGTG TGCCCAGCCC TCCCACCGCT GGTCCCGGCT GCCAGGAGGC TGGCCGCTGG | 780 |
| CGGGAAGGGG CCGGGAACC TCAGAGCCCC GCGGAGACAG CAGCCGCCTT GTTCCTCAGC | 840 |
| CCGGTGGCTT TTTTTCCTCC TGCTCTCCCA GGGGACAGAC ACCACCGCCC CACCCCTCAC | 900 |
| GCCCCACCTC CCTGGGGGAT CCTTTCCGCC CCAGCCCTGA AAGCGTTAAT CCTGGAGCTT | 960 |
| TCTGCACACC CCCCAGCCGC TCCCGCCCAA GCTTCCTAAA AAAGAAAGGT GCAAAGTTTG | 1020 |
| GTCCAGGATA GAAAAATGAC TGATCAAAGG CAGGCGATAC TTCCTGTTGC CGGGACGCTA | 1080 |
| TATATAACGT GATGAGCGCA CGGGCTGCGG AGACGCACCG GAGCGCTCGC CCAGCCGCCG | 1140 |

1 6

CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CCGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20

-15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GGCGCCTGGG 1242

Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GCGGGGAGA AGGCTCCACT 1302

CGCTCCCTCC CAGG 1316

配列番号 : 2

配列の長さ : 9 8 9 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-2)

配列 :

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60

ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCCTTTC 120

TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171

Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe

-10

-5

1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219

Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu

5

10

15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267
 Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala
 20 25 30 35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC 315
 Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp
 40 45 50

AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG 363
 Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
 55 60 65

GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG 411
 Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
 70 75 80

TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA 459
 Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
 85 90 95

CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA 509
 His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
 100 105 110

ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTAGGAGAA 569

CACTTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG 629
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC 689
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCAGCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG 749
ATGGTTTTTT TTTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT 809
ATACCTCTAT ATTTCACTTC AGCATGGACA CCTTCAAACCT GCAGCACTTT TTGACAAACA 869
TCAGAAATGT TAATTTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT 929
GCTAACAATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGAATTGCA 989
TTTCATTATT AAAACAAGG CTAGTTCTTC CTTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTTGGGAGG 1049
GTAAGGACTA TAGCAGAATC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT 1109
GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTTG CATTTTGAAC 1169
AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTTTC 1229
TGCCACATTT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACTTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA 1289
GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTTGAAG 1349
CAGTGTTTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG 1409
ACTCCTTTTT GTGGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC 1469
TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAAT GTCTTCAGAC 1529
ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT 1589
AAGTATCTGT AACTATTTTA ACTCTCAAAA CTTGTGATAT ACAAAGTCTA AATTATTAGA 1649
CGACCAATAC TTTAGGTTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC 1709
TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT 1769
CCCTTAAAT TCCTCTTCGT ATGAGTATTT GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT 1829
CTATTGGATG GACTTTTGAG ACTCAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGCG 1889
GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTGAGTA AGTTGTATAT 1949
GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAACTAG AGAATTTTGA AAAATAATGG 2009
AAATCACAAG GATCTTTCTT AAATAAGTAA GAAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG 2069
GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT 2129

GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTTCCCTCTT GGGAAATAAG 2189
AGGTTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGTT ACTCTAAAAA GTATTTAATA 2249
ACCGTTTTGT TGTTGCTGTT GCTGTTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT 2309
TACTTCATTC TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGAA TTCTCAACTG 2369
TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATTT CACATTTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTTA 2429
TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTTCATAA 2489
AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGGAAAGTCAT GTTCATGTTT AGGAAGGTCA TTAGATAAAG 2549
CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTTT GTTAAATAAC 2609
TTTAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAAGTTCTC ATTAGGATGC 2669
AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCGGC 2729
ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCCGGCA GATCACCTGA 2789
GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC 2849
AAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC 2909
AGGAGAATCT CTTGAACCCT CGAGGCGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA 2969
CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC 3029
AAAAAGATTC TTCTTCATGC AGAACATACG GCAGTCAACA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG 3089
TGTCCAAGTC ACTTATTTTG AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCCC 3149
AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCCA TTTAAGGAGT 3209
AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCTC TTTGCTTTGT 3269
AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTTAAT ATGTGAAGGT 3329
TTTAGGCTGT GTTTTCCCCT CCTGTTCTTT TTTTCTGCCA GCCCTTTGTC ATTTTTCAG 3389
GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAGTCCA TTTTGCCCCCT 3449
TTTTTTATTT TCTGGTTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTTGAG ATTTATAAAT 3509
GAAGTTTAAT AAGTTTCTGT AGCTTTGATT TTTCTCTTTC ATATTTGTTA TCTTGCATAA 3569
GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC 3629
TTACACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATACACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC 3689

2 0

GTAATATAGT CAAGTGTTTG AAGGTATTTA TTTTAAATAG CGTCTTTAGT TGTGGACTGG 3749
 TTCAAGTTTT TCTGCCAATG ATTTCTTCAA ATTTATCAAA TATTTTTCCA TCATGAAGTA 3809
 AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTTT AACAGTTTA 3869
 AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAGCTTAA CTGCAGGCTT ACGCTTTTGA 3929
 GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTTACT 3989
 TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAGGAAA GAAAGAACTT 4049
 CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAGAAT 4109
 GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT 4169
 ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGACTAATGA ACACCCTACC 4229
 CTTCTTTCCT TTCCTCTCAC ATTTTCATGAG CGTTTTGTAG GTAACGAGAA AATTGACTTG 4289
 CATTTGCATT ACAAGGAGGA GAAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAGT TTTGTTCTGT 4349
 CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409
 CCAAGTGAAA AGTCTTTCCA AAAGTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGGAA ACGATTTGAG 4469
 GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571
 Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser
 120 125 130 135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619
 Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu
 140 145 150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667

2 1

Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn

155

160

165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715

Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile

170

175

GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775
ACATTCTTGG TCAAACCTTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835
CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAACCTCATCT TCTCACAGAT 4895
AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA TCAAATCTTG CCCATAGGCA 4955
AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015
CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075
TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC AGGCATGGTG GCTTACTCCT 5135
ATAATCCCAA CATTTTGGGG GGCCAAGGTA GGCAGATCAC TTGAGGTCAG GATTTCAAGA 5195
CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT TAGCTGGGCA 5255
TGGTAGCAGG CACTTCTAGT ACCAGCTACT CAGGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 5315
CAGGAGATGG AGGTTGCAGT GAGCTGAGAT TGTACCACTG CACTCCAGTC TGGGCAACAG 5375
AGCAAGATTT CATCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACATTAGA AATGTGTACT 5435
TGGCTTTGTT ACCTATGGTA TTAGTGCATC TATTGCATGG AACTTCCAAG CTACTCTGGT 5495
TGTGTTAAGC TCTTCATTGG GTACAGGTCA CTAGTATTAA GTTCAGGTTA TTCGGATGCA 5555
TTCCACGGTA GTGATGACAA TTCATCAGGC TAGTGTGTGT GTTCACCTTG TCACTCCAC 5615
CACTAGACTA ATCTCAGACC TCACTCAAA GACACATTAC ACTAAAGATG ATTTGCTTTT 5675
TTGTGTTTAA TCAAGCAATG GTATAAACCA GCTTGACTCT CCCCAAACAG TTTTTCGTAC 5735
TACAAAGAAG TTTATGAAGC AGAGAAATGT GAATTGATAT ATATATGAGA TTCTAACCCA 5795
GTTCCAGCAT TGTTTCATTG TGTAATTGAA ATCATAGACA AGCCATTTTA GCCTTTGCTT 5855

2 2

TCTTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAATGA AGGAAGGGGT ATTAAAAGGA GTGATCAAAT 5915
TTTAACATTC TCTTTAATTA ATTCATTTTT AATTTTACTT TTTTTCATTT ATTGTGCACT 5975
TACTATGTGG TACTGTGCTA TAGAGGCTTT AACATTTATA AAAACACTGT GAAAGTTGCT 6035
TCAGATGAAT ATAGGTAGTA GAACGGCAGA ACTAGTATTC AAAGCCAGGT CTGATGAATC 6095
CAAAAACAAA CACCCATTAC TCCCATTTTC TGGGACATAC TTACTCTACC CAGATGCTCT 6155
GGGCTTTGTA ATGCCTATGT AAATAACATA GTTTTATGTT TGGTTATTTT CCTATGTAAT 6215
GTCTACTTAT ATATCTGTAT CTATCTCTTG CTTTGTTTCC AAAGGTAAAC TATGTGTCTA 6275
AATGTGGGCA AAAAATAACA CACTATTCCA AATTACTGTT CAAATTCCTT TAAGTCAGTG 6335
ATAATTATTT GTTTTGACAT TAATCATGAA GTTCCCTGTG GGTACTAGGT AAACCTTTAA 6395
TAGAATGTTA ATGTTTGTAT TCATTATAAG AATTTTGGC TGTTACTTAT TTACAACAAT 6455
ATTTCACTCT AATTAGACAT TACTAACT TTCTCTTGAA AACAATGCCC AAAAAAGAAC 6515
ATTAGAAGAC ACGTAAGCTC AGTTGGTCTC TGCCACTAAG ACCAGCCAAC AGAAGCTTGA 6575
TTTTATTCAA ACTTTGCATT TTAGCATATT TTATCTTGGA AAATTCAATT GTGTTGGTTT 6635
TTTGTTTTTG TTTGTATTGA ATAGACTCTC AGAAATCCAA TTGTTGAGTA AATCTTCTGG 6695
GTTTTCTAAC CTTTCTTTAG AT GTT ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG 6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190

195

200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205

210

215

2 3

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220

225

230

235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240

245

250

GTATGATAAT CTAAAATAAA AAGATCAATC AGAAATCAAA GACACCTATT TATCATAAAC 7000

CAGGAACAAG ACTGCATGTA TGTTTAGTTG TGTGGATCTT GTTCCCTGT TGAATCATT 7060

GTTGGACTGA AAAAGTTTCC ACCTGATAAT GTAGATGTGA TTCCACAAAC AGTTATACAA 7120

GGTTTTGTTC TCACCCCTGC TCCCAGTTT CCTGTAAAG TATGTTGAAC ACTCTAAGAG 7180

AAGAGAAATG CATTTGAAGG CAGGGCTGTA TCTCAGGGAG TCGCTTCCAG ATCCCTTAAC 7240

GCTTCTGTAA GCAGCCCCTC TAGACCACCA AGGAGAAGCT CTATAACCAC TTTGTATCTT 7300

ACATTGCACC TCTACCAAGA AGCTCTGTTG TATTTACTTG GTAATTCTCT CCAGGTAGGC 7360

TTTTCGTAGC TTACAAATAT GTTCTTATTA ATCCTCATGA TATGGCCTGC ATTAATAATTA 7420

TTTTAATGGC ATATGTTATG AGAATTAATG AGATAAAATC TGAAAAGTGT TTGAGCCTCT 7480

TGTAGGAAAA AGCTAGTTAC AGCAAAATGT TCTCACATCT TATAAGTTTA TATAAAGATT 7540

CTCCTTTAGA AATGGTGTGA GAGAGAAACA GAGAGAGATA GGGAGAGAAG TGTGAAAGAA 7600

TCTGAAGAAA AGGAGTTTCA TCCAGTGTGG ACTGTAAGCT TTACGACACA TGATGGAAAG 7660

AGTTCTGACT TCAGTAAGCA TTGGGAGGAC ATGCTAGAAG AAAAAGGAAG AAGAGTTTCC 7720

ATAATGCAGA CAGGGTCAGT GAGAAATTCA TTCAGGTCCT CACCAGTAGT TAAATGACTG 7780

TATAGTCTTG CACTACCCTA AAAAATTCA AGTATCTGAA ACCGGGGCAA CAGATTTTAG 7840

GAGACCAACG TCTTTGAGAG CTGATTGCTT TTGCTTATGC AAAGAGTAAA CTTTATGTT 7900

TTGAGCAAAC CAAAAGTATT CTTTGAACGT ATAATTAGCC CTGAAGCCGA AAGAAAAGAG 7960

AAAATCAGAG ACCGTTAGAA TTGGAAGCAA CCAAATCCC TATTTTATAA ATGAGGACAT 8020

TTTAACCCAG AAAGATGAAC CGATTTGGCT TAGGGCTCAC AGATACTAAG TGA CTCATGT 8080
 CATTAATAGA AATGTTAGTT CCTCCCTCTT AGGTTTGTAC CCTAGCTTAT TACTGAAATA 8140
 TTCTCTAGGC TGTGTGTCTC CTTTAGTTCC TCGACCTCAT GTCTTTGAGT TTTCAGATAT 8200
 CCTCCTCATG GAGGTAGTCC TCTGGTGCTA TGTGTATTCT TTAAAGGCTA GTTACGGCAA 8260
 TTAACCTATC AACTAGCGCC TACTAATGAA ACTTTGTATT ACAAAGTAGC TAACTTGAAT 8320
 ACTTTCCTTT TTTTCTGAAA TGTTATGGTG GTAATTTCTC AAACTTTTTC TTAGAAAAC 8380
 GAGAGTGATG TGTCTTATTT TCTACTGTTA ATTTTCAAAA TTAGGAGCTT CTTCCAAAGT 8440
 TTTGTTGGAT GCCAAAAATA TATAGCATAT TATCTTATTA TAACAAAAAA TATTTATCTC 8500
 AGTTCTTAGA AATAAATGGT GTCACCTAAC TCCCTCTCAA AAGAAAAGGT TATCATTGAA 8560
 ATATAATTAT GAAATTCTGC AAGAACCTTT TGCCTCACGC TTGTTTTATG ATGGCATTGG 8620
 ATGAATATAA ATGATGTGAA CACTTATCTG GGCTTTTGCT TTATGCAG AT ATT GAC 8676

Asp Ile Asp

CTC TGT GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC 8724
 Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr
 255 260 265 270

TTC GAG CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG 8772
 Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val
 275 280 285

GGA GCA GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC 8820
 Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp
 290 295 300

CAG ATC CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA 8868

2 5

Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln

305

310

315

GAC ACC TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC 8916

Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr

320

325

330

CAC TTT CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC 8964

His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe

335

340

345

350

CTT CAC AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA 9012

Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu

355

360

365

ATG ATA GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA 9054

Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

370

375

380

TAACTGGAAA TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA 9114

ACTGTTTCTC AGGCACTTGA GGCTTTCAGT GATATCTTTC TCATTACCAG TGAATAATTT 9174

TGCCACAGGG TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA 9234

ACCCCAAATG GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTTCCC 9294

TTATTACTGC TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTAAAAAAA AAAAATACTAGA CTCCACTGGG 9354

CCTTACTAAA TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTTGG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG 9414

CTTTTATTAG AAAGCCATAT TTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT 9474

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
40 45 50

| | | |
|---|-----|-----|
| Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu | | |
| 55 | 60 | 65 |
| Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys | | |
| 70 | 75 | 80 |
| Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys | | |
| 160 | 165 | 170 |
| Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala | | |
| 175 | 180 | 185 |
| Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp | | |
| 190 | 195 | 200 |
| Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile | | |
| 205 | 210 | 215 |
| Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys | | |
| 220 | 225 | 230 |
| Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile | | |
| 235 | 240 | 245 |

2 8

Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile
250 255 260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu
265 270 275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr
280 285 290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser
295 300 305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu
310 315 320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr
325 330 335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe
340 345 350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly
355 360 365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
370 375 380

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列 :

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CAGGACAACA TATGTTCCGG AACAGTGAA TCAACTCAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
TTATAA 1206

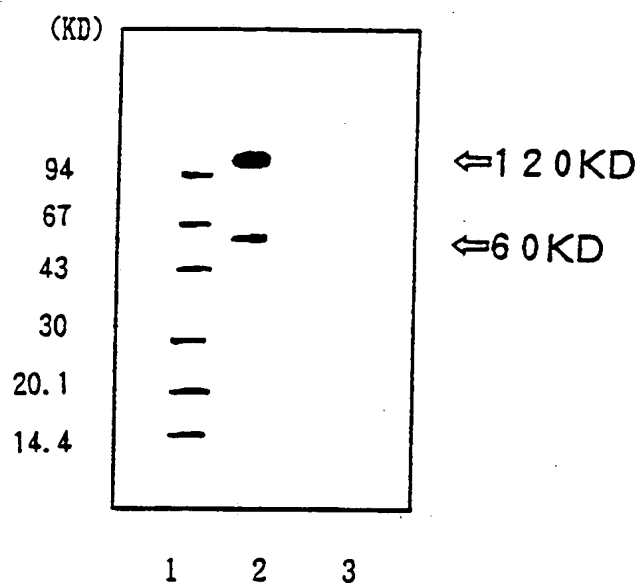
請 求 の 範 囲

1. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA。
2. 配列番号 1 には OCIF 遺伝子の第 1 エクソンが含まれ、配列番号 2 には第 2、第 3、第 4、第 5 エクソンが含まれ、且つ、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間におよそ 17kb のヌクレオチドが介在する、クレーム 1 に記載の DNA。
3. 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。
 - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);
 - (i) 還元条件下で約 60kD
 - (ii) 非還元条件下で約 60kD 及び約 120kD
 - (b) アミノ酸配列;
配列表配列番号 3 のアミノ酸配列を有する。
 - (c) 親和性;
陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
 - (d) 熱安定性;
 - (i) 70℃、10 分間または 56℃、30 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
 - (ii) 90℃、10 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。
4. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA を発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造することを特徴とする破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質の製造法。
 - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);

- (i) 還元条件下で約60kD
- (ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD
- (b) アミノ酸配列;
配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。
- (c) 親和性;
陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
- (d) 熱安定性;
 - (i) 70°C、10分間または56°C、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
 - (ii) 90°C、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

1 / 1

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C16 C12N15/00, C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C12N15/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Cancer Research, (1995), Vol. 55, Toshiyuki Yoneda, et al. "Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer" P. 1989-1993 | 1 - 4 |
| A | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) Vol. 87 Kukita A. et al. "Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells" P. 3023-3026 | 1 - 4 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
September 29, 1997 (29. 09. 97)

Date of mailing of the international search report
October 7, 1997 (07. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl¹ C12N15/00, C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl¹ C12N15/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | Cancer Research, (1995), VOL. 55, Toshiyuki Yoneda. et al 「Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer」 P. 1989-1993 | 1-4 |
| A | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) VOL. 87 Kukita A. et al 「Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells」 P. 3023-3026 | 1-4 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.09.97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節

4B

8515

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

